

31471 E/16 SASAKIT 29.08.80-JP-119313 (10.03.82) A61k-35/24 A61k-37/02 Double stranded DNA - D-glutaric acid-D-lysine copolymer adduct - used for treating auto:immune diseases, esp. systemic lupus erythematoses	A96 804 SASA/ 29.08.80 *J5 7042-632	A(10-E, 12-V1) B(4-84A, 4-C3, 12-A7, 12-D2) 4 179
<p>Adduct of double-stranded DNA with D-glutamic acid-D-lysine copolymer is new. The adduct (dsDNA-D-GL) has the following physico-chemical properties: (i) appearance: amorphous white powder; (ii) mpt. 263-4°C (dec); (iii) solubility: soluble in H<sub>2</sub>O, 0.01M phosphate buffer, aq. NaCl; insoluble in MeOH, EtOH, BuOH, Me<sub>2</sub>CO, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>; (iv) specific rotation: <math>[\alpha]_D^{25} + 36.67</math>; (v) acidity: pH 5.8-6.0 (1.2% aq. soln.); (vi) colour reaction: positive to <math>\alpha</math>-naphthol, diphenylamine, cysteine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, indole, Feulgen's, biuret, Cl-KI, and Cu-Folin reactions; negative to Lieberman's, Zimmerman, and FeCl<sub>3</sub> reactions; (vii) elemental analysis: C 42%, H 6%, N 13%; and (viii) characteristic IR and UV spectra.</p> <p><u>USE/ADVANTAGE</u> dsDNA-D-GL specifically induces immunological tolerance for double-stranded DNA (dsDNA) to decrease dsDNA antibody titre and cell number in dsDNA antibody production, and is effective in treatment or prevention of</p>	<p>autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematoses. dsDNA-D-GL may be administered orally, subcutaneously or intraperitoneally at a single or in divided doses as an aq. soln. of 10-50 mg/ml once or several times a week.</p> <p><u>PREPARATION</u> DNA, commercially available or extracted from animal tissues, is treated ultrasonically in order to make the size uniform, and then with nuclease to give dsDNA. dsDNA is oxidized with NaIO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O or a buffer soln. under cooling or at room temp. for 1-2 hr. The lysine copolymer (D-GL) in the same solvent as above is added (excess NaIO<sub>4</sub> is removed by addition of ethylene glycol) at pH 8-10 under cooling or at room temp. for 1-12 hr. The product is then reduced with NaBH<sub>4</sub> to give the adduct, which may be purified by gel filtration or chromatography using ion exchange resins.(8ppW52)</p>	J57042632

BEST AVAILABLE COPY

AP

(1)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-42632

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 37/02  
35/24

識別記号

庁内整理番号  
7138-4C  
7138-4C

⑬ 公開 昭和57年(1982)3月10日

発明の数 3  
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ 二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

⑮ 特 願 昭55-119313

⑯ 出 願 昭55(1980)8月29日

⑰ 発 明 者 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑱ 出 願 人 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑲ 出 願 人 石田名香雄

仙台市角五郎一丁目5-40

⑳ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外1名

明 細 書

水溶液)

1. 発明の名称

二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

2. 特許請求の範囲

1. 次の特性

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度  $[\alpha]_D^{25} = +3.667$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH 5.8~6.0 (1.2%)

- (6) 呈色反応 α-ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システイン試薬反応、インドール反応、フョイルゲン反応、ビフレット反応、C<sub>6</sub>-KI 反応、ホ-フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジッメルマン反応、塩化鉄2液反応は陰性
- (7) 赤外線吸収スペクトル 第1図
- (8) 紫外線吸収スペクトル 第2図
- (9) 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%を有する二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物、
2. 二本鎖DNAの塩化物にD-グルタミン酸-

D-リジンコポリマーを反応せしめ、次いでこれを還元することを特徴とする二本鎖 DNA と D-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物の製造法。

### 3. 次の物性

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点  $256.3 \sim 264.0^\circ\text{C}$  (分解)
- (3) 溶解性 水、0.01 M リン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度  $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH 5.8~6.0 (1.2% 水溶液)
- (6) 呈色反応  $\alpha$ -ナフトール反応、ジフェニ

ルアミン反応、シスチン酸塩反応、インドール反応、フオールゲン反応、ピクレット反応、CB-KI 反応、銅-フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジシメルマン反応、塩化第 2 鉄反応は陰性

### ⑦ 赤外線吸収スペクトル 第 1 図

### ⑧ 赤外線吸収スペクトル 第 2 図

- ⑨ 元素分析組成 C: 約 42%, H: 約 6%, N: 約 13% を有する二本鎖 DNA と D-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を有効成分として含有する薬剤。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な二本鎖 DNA と D-グルタミ

ン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤に関する。

自己免疫性疾患は、自分自身で自己抗体（自分自身の組織抗原に対して抗体様の活性をもつもの）を産生する疾患であり、自分自身の組織抗原に対して抗体を有するかあるいは抗体を産生するため、自分自身の組織、細胞を自ら破壊するという極めて不合理な疾患である。そして、自己免疫性疾患には、全身性エリテマトーデス（以下 SLE と略記する）、橋本氏病、関節性狼瘡、重症筋無力症、リウマチ様関節炎、自己免疫性溶血性貧血等がある。

SLE では、自己抗体としてデオキシリボ核

酸（DNA）抗体、赤血球抗体、リンパ球抗体及びその他の組織抗体が血液中に出現し、このリンパ球抗体の出現はリンパ球の減少、赤血球抗体の出現は溶血性貧血等の病態を惹起する。この中で最も問題とされるのは DNA 抗体であり、組織の破壊によつて細胞内から出てきた DNA が血液中で DNA 抗体と凝集して DNA-DNA 抗体免疫複合体を形成し、血管炎、腎炎の原因となり、脳障害、筋炎、腎糸球体障害等を誘発する。

従来、SLE の治療には、ステロイド剤又はこれとエンドキサン、サイクロホスファミド等の免疫抑制剤との併用が使用されていた。

しかし、これらの薬剤を使用すると、免疫不全、消化器障害、高圧亢進、骨粗鬆症、無

慢性大腸骨髄腫死、急性肝腎皮質不全、白血球減少等の副作用を惹起する欠点があつた。

斯る実状において、本発明者は自己免疫性疾患の治療に関し検討を行い、SLEにおいて、DNA抗体の産生を特異的に抑制することができれば、理想的な治療がなされるのではないかと考え、種々研究を行つた結果、二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物が斯る作用を有することを見出し、本発明を完成した。

従つて、本発明の目的は、新規な二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を提供せんとするものである。

本発明の他の目的は、当該結合物を製造する方法を提供せんとするものである。

室温で1~12時間行うのが好ましい。

次いで、dsDNAの酸化物にD-グルタミン酸-D-リジンコポリマー(以下D-GLと略記する)を反応させる。D-GLは一般に市販されているものを使用でき、これは通常dsDNAの10~30重量倍を使用するのが好ましい。反応は、上記と同じ溶液中、実施には、上記反応液にエチレングリコール等を加えて余分の過ヨウ素酸ナトリウムを除去したものにD-GLを加えて行うのが好ましい。反応系はpH8~10に保持し、反応は冷却下ないし室温で1~12時間行われる。

更に、斯くして得られる反応物を水素化ホウ素ナトリウム等で還元すればdsDNAとD-GLの結合物が得られる。このものは、グル

本発明の更に他の目的は、当該結合物を有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤を提供せんとするものである。

本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物は、例えば次のようにして製造される。

まず、市販されているDNAあるいは動物から抽出したDNAを超音波等によつて処理してその大きさを細くした後スクレアーゼ処理して二本鎖DNA(以下dsDNAと略記する)を得る。動物細胞DNAは種々異抗原性が少ないので、本発明では、如何なる種類の動物のDNAも使用できる。このdsDNAは過ヨウ素酸ナトリウム等の酸化剤で処理してその酸化物とする。反応は、水又は緩衝液中、冷却下ないし

室温、イオン交換クロマトグラフィー等に行つて未反応のdsDNA、D-GLを除去し、精製することができる。

このようにして得られた本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物(以下、dsDNA-D-GLと略記する)は次のような物性を有する。

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度  $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH5.8~6.0(1.2%水溶液)

溶液)

- (5) 染色反応  $\alpha$ -ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システイン還元反応、インドール反応、フォイルゲン反応、ピクレット反応、 $C_{60}$ -KI 反応、 $\beta$ -フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジニメルマン反応、塩化第2鉄反応は陰性

- (7) 赤外線吸収スペクトル 第1図  
 (8) 赤外線吸収スペクトル 第2図  
 (9) 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%

本発明の dsDNA - D - GL は、前述の実施例に示すごとく、これを動物に投与すると、特異的に dsDNA に対する免疫寛容を誘導し、

しながら10分間超音波処理を行つた。これに、0.1 mM 塩化亜鉛含有0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml、ヌクレアーゼ S (10<sup>5</sup> 単位/ml) 2.5 ml、蒸留水 17.5 ml を加えて、一本鎖 DNA を分解した後、4℃で24時間 PBS に透析した。これをセファロース 6 B カラムでゲルが通し、各分出分画の OD<sub>260</sub> を測定すると、void volume の位置に単一のピークが観察される。この部分を集め、凍結乾燥して170 mg の dsDNA を得た。

#### (ii) dsDNA - D - GL の製造

(i) で得た dsDNA 10 mg を 1 mg/ml になるように蒸留水に溶解し、攪拌下これに0.2 M 塩化ヨウ素酸ナトリウム水溶液 10 ml をゆつくり加える。室温で攪拌しながら1時間反応さ

す。dsDNA 抗体価及び dsDNA 抗体産生細胞数が著しく減少するので、自己免疫性疾患の治療及び予防をすることができる。dsDNA - D - GL は、例えば 10 ~ 50 mg/ml の水溶液とし、週に1回ないしは数回、給口、皮下注射、腹腔内注射等によつて投与するのが好ましく、急性病状態化時には更に投与量を増すこともできる。

次に実施例を挙げて説明する。

#### 実施例 1

##### (i) dsDNA の調製

市販仔牛胸腺 DNA 200 mg をリン緩衝生理食塩水 (以下、PBS と略記する) 100 ml に溶解し、破砕装置 (Tomy model 150 P) を用いて、150 W で氷冷下、1分毎に停止

せ、反応液にエチレングリコールを0.006 M になるように加え、室温で10分間反応させて、過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを除去する。この溶液に、市販の D - GL (分子量 49,000、D - グルタミン酸 : D - リジン = 60 : 40) 200 mg を 1% 炭酸水素カリウム水溶液 20 ml とかしたものを、dsDNA : D - GL が 1 : 20 (重量) になるように加え、室温で1時間攪拌して反応させる。この間 5% 炭酸カリウムを加えて、反応液の pH を 9.5 に保持する。この反応液に水酸化ホウ素ナトリウムを 1 mg/ml になるように加え、4℃で16時間放置後、透析チューブに入れて、0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液に対して4℃で48時間透析した。これをセファロース 6 B カラムで

ゲル通過し、溶出各分画の dsDNA 濃度を OD<sub>260</sub> にて、D - GL 濃度を Lowry - Folin 法で測定した。OD<sub>260</sub> の吸収ピークは void volume の位置に単一のピークを示した。D - GL のピークは 2 本現われ、その 1 本は void volume の位置で、OD<sub>260</sub> のピークと完全に一致し、他の 1 本はこれよりおくれ出て現れた。OD<sub>260</sub> のピークに従って分画を集め、凍結乾燥して 4.6 mg の粉末を得た。

新しく得られた dsDNA - D - GL の dsDNA と D - GL の割合は 1 対 4 であった。またこのものの超速心分析の結果は第 3 図のとおりであり、単一であった。

#### 実施例 2

dsDNA - D - GL 投与による dsDNA に対す

る免疫寛容の誘導：

その結果は第 4 図のとおりであり、dsDNA 抗体価は 14 匹中 11 匹で上昇せずまた、ssDNA 抗体価は 14 匹中 6 匹は上昇しなかつた。また、ssDNA 抗体価上昇抑制効果は dsDNA 抗体価上昇抑制より弱く、dsDNA - D - GL は dsDNA 抗体価の上昇を特異的に抑制することがわかる。

(i) dsDNA - D - GL 投与後の脾臓中の dsDNA 抗体産生細胞数の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、1.00 μg / ml 溶液を調製する。4ヶ月令の NZB / W F<sub>1</sub> 雌マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回づつ 12ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様に生理

食塩水を投与した。

(ii) dsDNA - D - GL 投与後の血中 dsDNA 抗体の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、1.00 μg / ml 溶液を調製する。4ヶ月令の NZB / W F<sub>1</sub> 雌マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回づつ 12ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様に生理食塩水を投与した。12ヶ月令になつた時、採血し、血清中の dsDNA 抗体の力価と一本鎖 DNA (以下、ss-DNA と略記する) 抗体の力価を受身赤血球凝集反応法 (dsDNA 又は ssDNA を吸着させた赤血球の浮遊液に dsDNA 抗体又は ssDNA 抗体を含んだ血清を加えると抗原抗体反応をおこし赤血球が凝集する反応)

生理食塩水を投与した。12ヶ月令になつた時、マウスを殺し、脾臓をとり出し、ステンレス製網の上におき、上から加圧し、脾臓細胞を網の網目を透加させることにより、脾臓細胞をバラバラにする。この細胞に、dsDNA を吸着させた羊赤血球と、モルモットの脾臓を加えた (7.5 抗体測定の際には、さらに IgG 血清を加えた) 後、Cunnigham - Szenberg chamber に射入する。この chamber を 3.7℃ で 1 時間インキュベートすると抗体を産生している細胞のまわりの羊赤血球が凝集し、ブランクを形成するので、この数を数えて dsDNA 抗体産生細胞数を求めた。

その結果は第 1 表のとおりであり、対照群では、1.9 × dsDNA 抗体産生細胞数は 6135

組／脾臓、7s dsDNA 抗体産生細胞数は  
2928 個／脾臓であつたが、dsDNA-D-  
GL 投与群では、それぞれ742 個／脾臓、  
400 個／脾臓で dsDNA-D-GL 投与群で  
は、dsDNA に対する免疫寛容が誘導された。

以下余白

第1表

対 照	10s dsDNA 抗体産生細胞数／脾臓	7s dsDNA 抗体産生細胞数	dsDNA-D-GL 投与群	10s dsDNA 抗体産生細胞数／脾臓	7s dsDNA 抗体産生細胞数
1	6700	0	0	0	0
2	3000	ND	0	0	0
3	12000	4800	0	0	0
4	4600	900	0	0	0
5	5700	0	0	0	0
6	3500	2800	0	0	ND
7	5300	1600	0	0	ND
8	5000	ND	2600	2600	ND
9	8500	ND	1600	1600	ND
10	8000	ND	0	0	ND
11	9400	10400	2400	2400	0
12	2200	ND	3600	3600	3200
13	5500	ND	100	100	ND
14	8600	ND	100	100	ND
平均	6135.7±2650	2928±3705	742.9±1250	742.9±1250	400±1131

### 実施例3

既に dsDNA 抗体を産生している NZB/W  
F<sub>1</sub> マウスに対する dsDNA-D-GL の治療効  
果

一群15匹の7ヶ月令の雌 NZB/W F<sub>1</sub> マウ

ス（既に dsDNA 抗体を産生しているもの）に、4.

dsDNA-D-GL 100 μg/μl 生理食塩水 1

μl を、週1回12ヶ月令まで腹腔に投与し、

12ヶ月令での生存数を測定した。対照群に

は、同マウス21匹を使用し、生理食塩水を

投与した。

その結果は第2表のとおりであり、dsDNA

-D-GL の投与により自己免疫性疾患を治

ることができることがわかる。

### 第2表

対 照	生存数/使用数(匹)	生存率 (%)
dsDNA-D-GL 投与群	14/21	66.7
対 照	15/15	100

図面の簡単な説明

※1図は本発明の二本鎖 DNA と D-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物の紫外吸収スペクトル、第2図は同結合物の紫外吸収スペクトル、第3図は同結合物の同位体分析の結果、第4図は同結合物の投与による一本鎖 DNA 抗体及び二本鎖 DNA 抗体の抗体価上昇抑制効果を示す。

以上

样品号 57-42632 (7)





